

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19097

研究課題名(和文)ゲノム情報に基づく動物特殊機能の進化および分子基盤解明と高機能センサーへの展開

研究課題名(英文)Elucidation of evolutionary and molecular basis of animal special functions based on genome information and its application to highly functional sensors

研究代表者

小川 智久(Ogawa, Tomohisa)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：80240901

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):「動物のもつ特殊機能」として、マムシ亜科毒蛇に特異的なピット器官受容体の TRPA1チャンネルおよび他のTRPチャンネルの進化および構造と機能の詳細を明らかにする。このため、(1)ハブゲノム解読によるTRPチャンネル群の遺伝子構造と進化の解明、(2)各種毒蛇のピット器官を含む様々な組織でのTRPチャンネルの遺伝子発現解析(トランスクリプトーム解析)、(3)TRPチャンネルタンパク質の酵母発現系構築を行った。その結果TRPA1遺伝子は3番染色体上に位置し、加速進化を示す毒遺伝子と異なること、ファクター TRPA1-yEGFP_p426GALを導入した酵母で膜上での局在発現に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マムシ亜科(Crotalinae, pit viper)が特異的に持っている赤外線受容装置のピット器官の受容体transient receptor potential (TRP)チャンネルの構造と機能、および進化についてはまだ不明な点が多い。特にどのような赤外線を受容してシグナルに変えているのか。この問題が明らかになれば、例えばテラヘルツ光センサーデバイスなど生物進化に基づく新規センサーデバイス開発に資することができる。

研究成果の概要(英文):As a "special function of animals", we elucidate the details of the evolution, structure and function of TRPA1 channel and other TRP channels in pit organ receptors specific to pit vipers. In this study, we elucidated the gene structure and evolution of the TRP channel group by decoding the hub genome(1), analyzed the gene expression of TRP channels in various tissues including pit organs (transcriptome analysis)(2), and constructed a yeast expression system for the TRP channel proteins (3). We found that the TRPA1 gene is located on chromosome 3, which is different from venom genes that show accelerated evolution and located on micro chromosomes, and that it is successfully localized to the membrane in yeast transfected with -factor TRPA1-yEGFP_p426GAL.

研究分野：タンパク質科学，酵素学

キーワード：TRPチャンネル 赤外線受容装置 ピット器官 毒蛇 ゲノム解読 酵母発現系

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまでに研究分担者の柴田らとの共同研究で、日本の重要な毒蛇ハブを対象としたオミクス研究を進めてきた。特に、奄美大島産ハブの全ゲノム解読では、毒液タンパク質遺伝子60個を同定し、その多様性が4つの機構(遺伝子多重化、加速進化、選択的スプライシング、トランススプライシング)によりもたらされていることを見出した(*Sci. Rep.* 8, 10.1038 (2018); *Toxins* 11, 581 (2019)など)。染色体レベルでのゲノムデータをもとに、「加速進化」のメカニズムを明らかにする目的で、改めてゲノム情報を精査していたところ、毒に対するインヒビタータンパク質の他に、獲物に反応して赤外線を感じ取るピット器管に特有な TRPA1 チャンネルの遺伝子も加速的に進化していることが示唆された。毒タンパク質もピット器管もいずれも獲物(被食者)の捕食に関わることで、ピット器管はクサリヘビ科のうちマムシ亜科毒ヘビにのみ存在し、クサリヘビ亜科毒ヘビやコブラ科には存在しない。「加速進化」のメカニズムを考える上で TRP チャンネル群の進化は興味深く、「加速進化」のメカニズム解明に繋がる知見が得られると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、「動物のもつ特殊機能」の進化、特に新奇機能獲得の遺伝学的・ゲノム科学的要因および特殊機能の構造要素などの分子基盤を解明し、その仕組みを利用して新規機能デバイスの開発に繋げることを目的とする。今回は、「動物のもつ特殊機能」の一つとして、毒蛇の中でマムシ亜科(*Crotalinae*, pit viper)が特異的に持っている赤外線受容装置のピット器官に着目し、その受容体本体である transient receptor potential (TRP) チャンネルの構造と機能、および進化を明らかにし、生物進化に基づく新規センサーデバイス開発(例えばテラヘルツ光センサーデバイス)に資する知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

今回、上記の目的「動物のもつ特殊機能」として、マムシ亜科毒蛇に特異的なピット器官受容体に着目し、TRPA1 チャンネルおよび他の TRP チャンネルの進化および構造と機能の詳細を明らかにする。このため、(1)マムシ亜科ヒメハブ(*Ovophis okinavensis*)およびハブゲノム解読による TRP チャンネル群の遺伝子構造と進化の解明、(2)各種毒蛇のピット器官を含む様々な組織での TRP チャンネルの遺伝子発現解析(トランスクリプトーム解析)、(3)TRP チャンネルタンパク質の酵母発現系構築と機能解析、(4)クライオ電子顕微鏡による TRP チャンネルの立体構造解析と赤外線感受機構の解明研究を行う。

4. 研究成果

(1)ゲノム解読による TRP チャンネル群の遺伝子構造と進化

ハブの染色体レベルでのゲノム解読を行いロングリードシーケンズデータや HiC データを追加して解析した。その結果、染色体レベルまで向上させることに成功した(断片数=20, N50 長=188 Mb)。そこで TRPA1 遺伝子の染色体上での位置を解析したところ、3番染色体上に位置していることが判明した。加速進化の特徴を示す毒タンパク質遺伝子やインヒビター遺伝子がマイクロ染色体に載っているのに対して(ホスホリパーゼ A₂ とセリンプロテアーゼは第9マイクロ染色体、メタロプロテアーゼは第7マイクロ染色体など)、TRPA1 遺伝子はマクロ染色体にあり異なっていた。同じ加速進化を示す TRPA1 であるが、毒タンパク質の加速進化の機構と異なることが示唆された。

(2)様々な組織での TRP チャンネルの遺伝子発現解析

ハブの各組織における TRP チャンネルファミリー遺伝子の発現を RNA-seq により解析したところ TRPA1 は転写レベルで最も発現し、脳および胚性線維芽細胞での発現が見られた(図1)。ピット器官では僅かに発現が見られたが、発現量は低いものであった。同じ脳でも異なる発現がみられたことから(脳1と脳2)、個体差や時期によって異なることも考えられた。他の TRP ファミリーについても解析したところ TRPV2 や TRPV4, TRPV6, TRPM などの発現量がピット器官で比較的高かった。

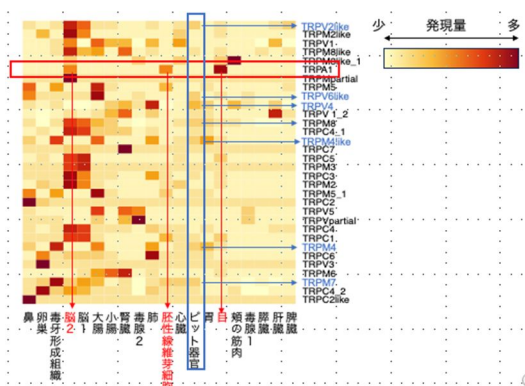


図1 TRP チャンネルの各組織での発現プロファイル

(3, 4) TRP チャネルタンパク質の酵母発現系構築と機能解析とクライオ電子顕微鏡解析

TRPA1 の酵母での発現系構築のため、誘導発現可能なベクター p426GAL と構成的発現の p426ADH を使用し、ハブ由来 TRPA1 のコドン最適化された人工遺伝子を用いて、さらに C 末端に HA タグや yEGFP を融合させた。また α ファクターシグナル配列を YEGFP と一緒に組み込むことで目的の遺伝子の発現を促進させる可能性があるため TRPA1 の N 末端側に α ファクターシグナル配列を融合させたコンストラクトも検討した (図 2)。

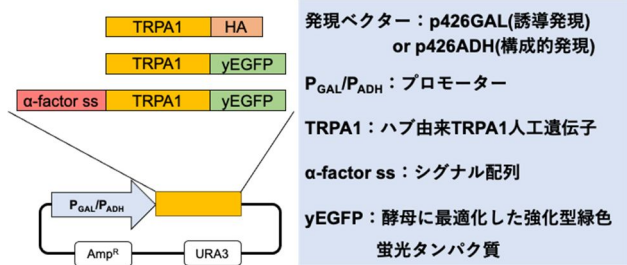


図 2 TRP チャネル酵母発現ベクターの構築

その結果、p426GAL プロモータでの誘導発現により TRPA1 の発現に成功した。図 3 に発現酵母の共焦点レーザー顕微鏡により TRPA1 と融合した yEGFP の蛍光での局在を調べた結果を示す。TRPA1-yEGFP_p426GAL では細胞質全体での発現と局在が見られたのに対して、 α ファクターシグナル配列を持つ場合には、酵母の膜上での局在が見られた (図 3)。しかし、クライオ電子顕微鏡で解析するために必要な大量のサンプル調製には至らず、収量を増やすための工夫が必要である。現在、酵母の様々な株での発現とタンパク質収量を増加させる 4 残基からなるペプチド配列の導入を引き続き検討している。また、 α ファクター-TRPA1-yEGFP_p426GAL を導入した酵母で膜上での局在が見られたことから、これを用いて TRPA1 の赤外線照射による細胞内 Ca^{2+} イオンの変化の解析により機能を調べる。

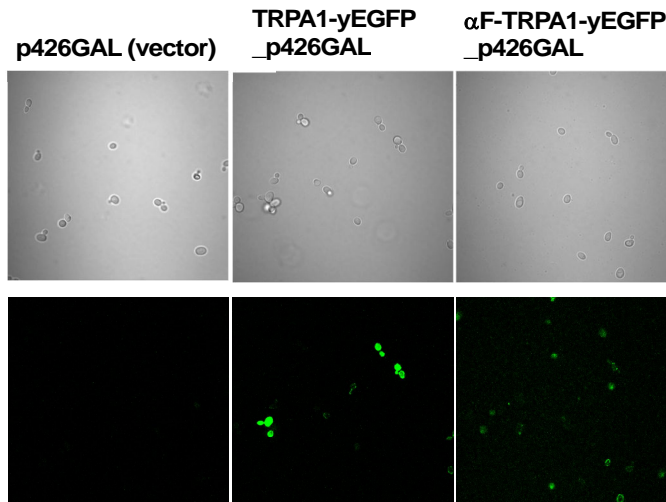


図 3 yEGFP 蛍光による TRPA1 の酵母での発現と局在

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Isomoto A, Shoguchi E, Hisata K, Inoue J, Inaba K, Satoh N, Ogawa T and Shibata H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Active expression of genes for protein modification enzymes in the venom gland of habu snakes revealed by comprehensive transcriptomic analyses.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins14050300	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Futai E, Kawasaki H, Sato S, Daoudi K, Hidaka M, Tomita T, Ogawa T.	4. 巻 15
2. 論文標題 A Metalloproteinase Cocktail from the Venom of Protobothrops flavoviridis Cleaves Amyloid Beta Peptides at the -Cleavage Site.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins15080500	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小川智久, 柴田弘紀, 上田直子, 佐藤矩行, 服部正策, 日高將文, 二井勇人
2. 発表標題 ベノミクス研究により明らかになった毒蛇ハブの新規毒成分の機能と毒関連特殊機能の進化
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会シンポジウム「動物毒って特異性が高いだけじゃない! どんどん広がる面白い世界」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sato T, Futai E, Hidaka M, Ogawa T
2. 発表標題 Identification of disulfide-rich peptides from Habu venom to regulate the activity of integrin,
3. 学会等名 60th Peptide Symposium
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ogawa T. Sakakibara R, Seki M, Hidaka M, Futai E
2. 発表標題 HABU SNAKE THREE-FINGER TOXINS SHOWED INHIBITORY ACTIVITY AGAINST β -SECRETASE INVOLVED IN AMYLOID PRODUCTION CAUSING ALZHEIMER DISEASE
3. 学会等名 60th Peptide Symposium
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川智久
2. 発表標題 HABU SNAKE VENOMICS REVEALS UNIQUE VENOM COMPONENTS RELATED TO THE PROTEOLYSIS ENZYMES AND INHIBITORS
3. 学会等名 12th General Meeting of the International Proteolysis Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川智久
2. 発表標題 毒蛇ハブベノミクス由来医薬シーズ：アルツハイマー病治療薬の探索
3. 学会等名 東京大学医科学研究所奄美病害動物研究施設第3棟改築記念シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柴田弘紀, 上田直子, 千々岩崇仁, 中村仁美, 服部正策, 服巻保幸, 大野素徳, 佐藤矩行, 小川智久
2. 発表標題 毒蛇ハブのゲノム解析で明らかになった毒液タンパク質遺伝子の進化
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会シンポジウム「動物毒って特異性が高いだけじゃない! どんどん広がる面白い世界」(招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 アミロイド を分解する酵素，及びこれを用いた医薬組成物	発明者 二井勇人，小川智久，川崎 創，佐藤伸一，日高將文	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-190410	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 セクレターゼ阻害剤，A ペプチド産生抑制剤及び医薬	発明者 二井勇人，榊原里奈，關 正義，日高將文，小川智久	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-106682	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 セクレターゼ阻害剤、A ペプチド産生抑制剤及び医薬	発明者 二井勇人，榊原里奈，關 正義，日高將文，小川智久	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT_JP2022_041795	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	柴田 弘紀 (Shibata Hiroki) (80315093)	九州大学・生体防御医学研究所・准教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------